云南植物研究 2007, 29 (2): 231～236
Acta Botanica Yunnanica

抗氧化系统在热激诱导的玉米幼苗耐热性形成中的作用*

李忠光, 龚 明**

(云南师范大学生命科学学院, 云南 昆明 650092)

摘要: 玉米幼苗经过42℃热激4 h并恢复4 h后, 显著提高了玉米幼苗在高温处理下的存活率。热激并恢复4 h后, 不同程度地提高了抗氧化酶系统过氧化氢酶 (CAT), 超氧化物歧化酶 (SOD), 谷胱甘肽还原酶 (GR), 抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 和过氧化物酶 (GPX) 的活性以及抗氧化剂还原型抗坏血酸 (ASA) 和谷胱甘肽 (GSH) 的含量, 且经过热激的玉米幼苗在高温处理期间及其后的恢复过程中均能保持相对较高的抗氧化酶活性和抗氧化剂水平, 说明保持较高的抗氧化酶活性和抗氧化剂水平是热激诱导的玉米幼苗耐热性形成的生理基础之一。

关键词: 玉米幼苗; 热激; 耐热性; 抗氧化酶; 抗氧化剂

中图分类号: Q 945　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0253-2700 (2007) 02-231-06

Involvement of Antioxidant Systems in Heat-Shock-Induced Heat Tolerance in Maize Seedlings

LI Zhong-Guang, GONG Ming

(*School of Life Sciences*, *Yunnan Normal University*, Kunming 650092, China)

Abstract: Heat-shock pretreatment at 42℃ for 4 h and recovery at 26.5℃ for 4 h greatly improved greatly survival percentage of maize seedlings under high temperature stress. Heat-shock pretreatment and recovery at 26.5℃ for 4 h significantly enhanced the activities of antioxidant enzymes CAT, SOD, GR and APX and the levels of antioxidants ASA and GSH in maize seedlings. The seedlings with heat-shock retained higher activities of antioxidant enzymes and higher levels of antioxidants than that without heat-shock during heat stress and recovery, indicating that the increase of activities of antioxidant enzymes and levels of antioxidants is the physiological basis for the formation of heat tolerance induced by heat-shock in maize seedlings.

Key words: Maize (*Zea mays*) seedlings; Heat shock; Heat tolerance; Antioxidant enzymes; Antioxidants

高温是限制粮食生产的主要胁迫因子之一, 高温胁迫往往导致氧化胁迫, 表现出超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot -}$), 过氧化氢 (H_2O_2), 羟自由基 (OH·) 等活性氧 (ROS) 的积累, 最终导致生物膜过氧化作用, 蛋白质结构破坏和DNA损伤 (Inze and Montagu, 2002; Nover等, 1989; Burke, 2001; Vranova等, 2002a)。植物体内ROS的产生被由过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽还原酶 (GR)、抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 和过氧化物酶 (GPX) 等组成的抗氧化酶系统, 以及由抗坏血酸 (ASA) 和谷胱甘肽 (GSH) 等抗氧化剂组成的非酶系统精密调控, 致使植物体内ROS保持在植物可以忍耐的生理水平 (Alscher等, 1997; Mallick and Mohn,

---

* 基金项目: 国家自然科学基金 (39860007, 30460016)、云南省自然科学基金 (2006C0030M) 及云南省教育厅基金 (06Y117B) 高校青年教师教学科研奖励计划 (2001年度)

** 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: gongming@public.km.yn.cn

收稿日期: 2006-06-14, 2006-09-18接受发表

作者简介: 李忠光 (1971-) 男, 高级实验师, 主要从事植物逆境生物学研究。E-mail: zhongguang_li@163.com; 电话: 0871-5517394

2000；Breusegem等，2001)。我们和其他研究者的结果表明热激可以提高玉米 (Gong等，2001)、烟草 (Gong等，1998a)、苹果 (Bowen等，2002) 等耐热性，但目前对热激诱导植物耐热性的具体生理机制尚未完全清楚。本文探讨了热激后和高温胁迫及恢复过程中抗氧化酶及抗氧化剂水平的变化情况，发现抗氧化系统在热激诱导的玉米幼苗耐热性形成中具有一定作用。

1 材料与方法

1.1 植物材料的培养

挑选饱满的玉米 (*Zea mays*) 品种晴3和鲁玉13的种子，以0.1% $HgCl_2$ 消毒10 min后，漂洗干净，于26.5℃下吸涨12 h，播于垫有6层湿润滤纸的带盖白磁盘 (24 cm×16 cm) 中，于26.5℃下黑暗中萌发60 h。选取长势一致的玉米幼苗做以下处理。

1.2 热激 (Heat shock，HS) 和热处理

上述玉米幼苗转入42℃的培养箱中进行热激处理4 h，热激结束后于26.5℃下恢复培养4 h，非热激 (Non-HS) 的对照组玉米幼苗始终培养在26.5℃的培养箱中，最后热激和非热激的玉米幼苗同时转入47℃或48℃高温下处理17 h。处理过的玉米幼苗取出后，于26.5℃、12 h光照的植物生长箱中恢复培养8 d，然后计算存活率。以在恢复期间能够恢复生长并转绿的玉米幼苗视为存活的幼苗。

1.3 抗氧化酶和抗氧化剂的测定

分别称取热激0 h (热激前)、4 h并恢复4 h、48℃高温处理17 h、高温处理后恢复24 h的黄化玉米幼苗的中胚轴0.5 g，转入液氮冷冻保存。按李忠光等 (2002) 的方法提取并测定愈创木酚过氧化物酶 (GPX)、过氧化氢酶 (CAT)、抗坏血酸过氧化物酶 (APX)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽还原酶 (GR) 等5种抗氧化酶活性；按李忠光等 (2003) 的方法提取并测定抗坏血酸 (ASA) /脱氢抗坏血酸 (DHA) 和还原型谷胱甘肽 (GSH) /氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 水平。

上述所有实验均重复3次，每次实验中有2次测定重复，图中所有数据均为平均值±标准误。所用药品GSH、GSSG、GR、氮蓝四唑 (NBT)、二硫硝基苯甲酸 (DTNB) 等购自Sigma公司，其余药品均为国产分析纯。

2 结果

2.1 热激诱导的玉米幼苗耐热性

上述萌发60 h的玉米幼苗经热激处理4 h、再恢复培养4 h后，转入高温下处理17 h。从图1可看出，热激处理显著提高了晴3和鲁玉13两种玉米幼苗在47℃和48℃两个高温处理下的存活率，且无论是经过热激还是未经过热激的晴3玉米幼苗其在高温处理下的存活率明显高于相对应的鲁玉13的存活率，表明热激处理能提高玉米幼苗的耐热性并且晴3玉米幼苗的耐热性强于鲁玉13。

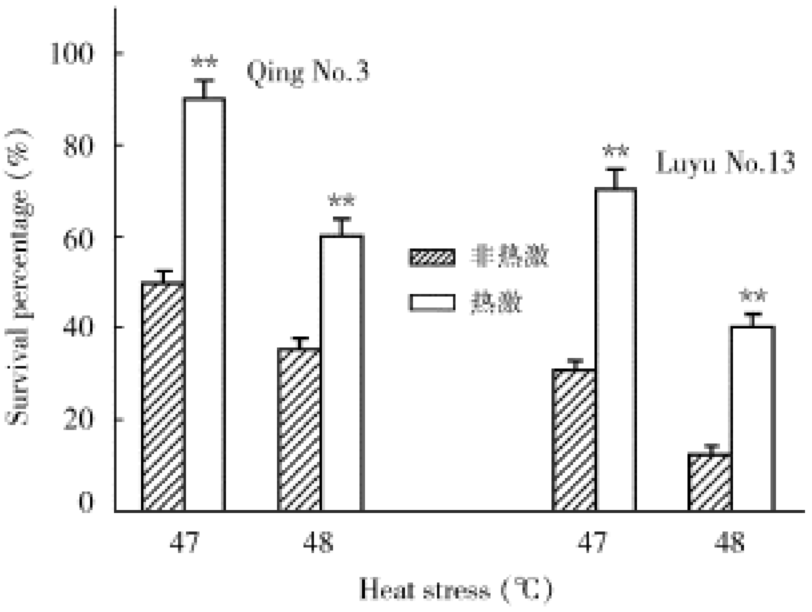

图1 热激对玉米幼苗耐热性的效应

** $P < 0.01$，与未经热激处理的对照相比

Fig. 1 Effect of heat-shock on heat tolerance in maize seedlings

** $P < 0.01$ compare with the treatment of non-heat shock

2.2 热激后和高温处理及恢复过程中抗氧化酶活性的变化

玉米幼苗经热激处理4 h，再恢复培养4 h后，转入48℃高温下处理17 h，而后取出并于26.5℃下恢复培养24 h，检测各处理阶段5种抗氧化酶活性的变化。如图2a～d所示，热激处理并恢复4 h不同程度地提高了两种玉米幼苗中5种抗氧化酶的活性。与未经热激处理的对照相比，热激处理组的CAT、SOD、GR和APX的活性明显增高。但GPX的活性变化不明显 (图2：e)。

当两种玉米幼苗在48℃高温下处理17 h后，其5种抗氧化酶的活性都比高温处理前有不同程度的下降。经热激处理的两种玉米幼苗5种抗氧化酶活性的下降幅度明显低于未作处理的对照 (图2)。

从图2还可看出，玉米幼苗经高温处理，而后恢复24 h，5种抗氧化酶活性呈现不同的变化：有的开始回升，如CAT和GPX；有的仍然在下降，如SOD、GR和APX，APX下降尤为明显。但除SOD和APX外 (图2：b，d)，经热激处理的玉米幼苗的3种抗氧化酶活性都明显高于

未经热激处理的对照（图 2：a，c，e）。

此外，无论是经过热激并恢复 4 h 后，还是高温胁迫及恢复过程中，耐热性较强的晴 3 玉米幼苗的 5 种抗氧化酶活性始终高于耐热性较弱的鲁玉 13 品种（图 2：a～e）。

2.3 热激后和高温处理及恢复过程中抗氧化剂水平的变化

如图 3 所示，热激处理明显地提高了两种玉米幼苗中还原型抗氧化剂 ASA 和 GSH 的水平。与未经热激处理的对照相比，经热激处理的晴 3

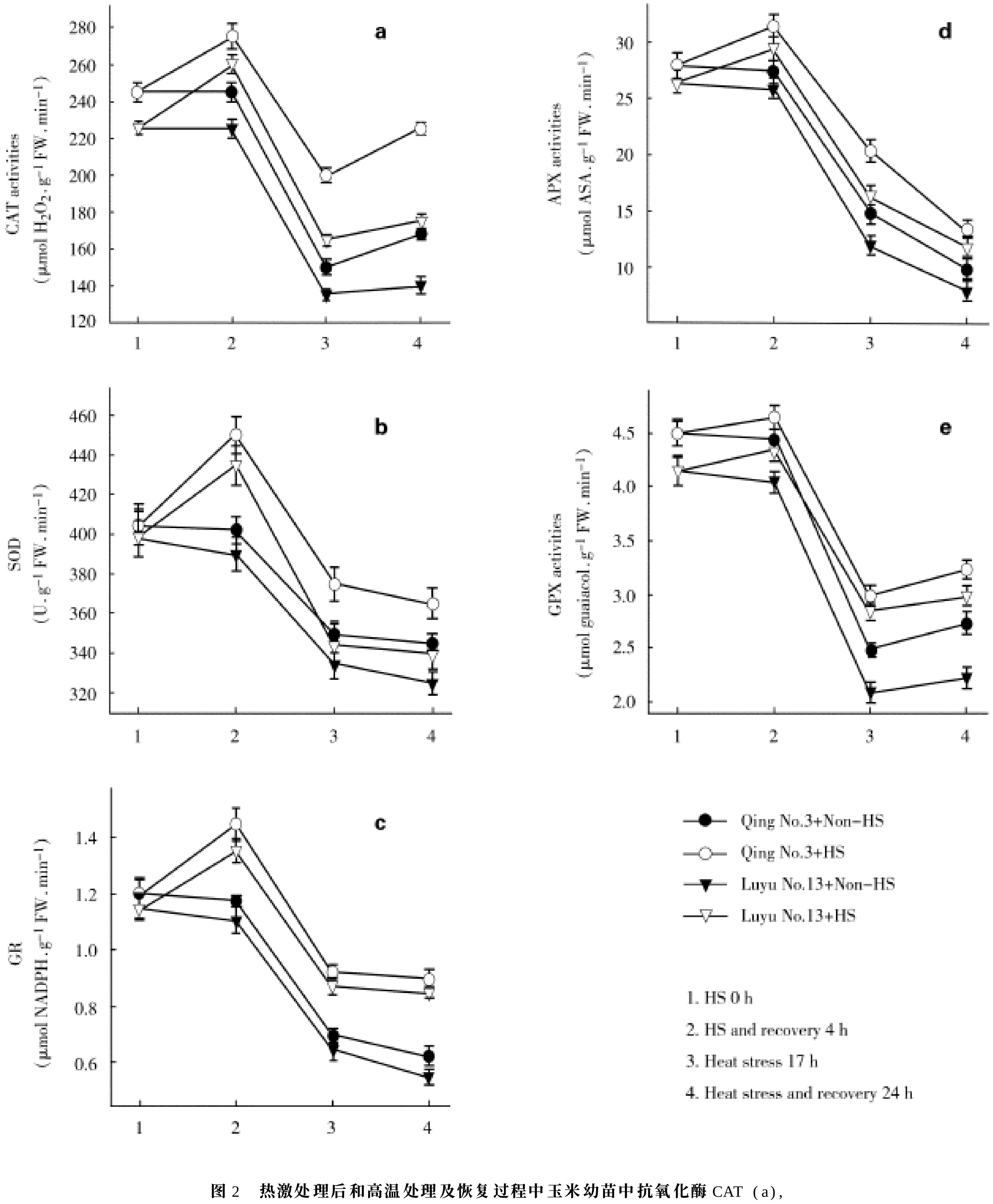

图 2　热激处理后和高温处理及恢复过程中玉米幼苗中抗氧化酶 CAT（a），SOD（b），GR（c），APX（d）和 GPX（e）活性的变化

Fig. 2　Changes of antioxidant enzyme CAT (a), SOD (b), GR (c), APX (d) and GPX (e) activities after the heat shock, heat stress and recovery in maize seedlings

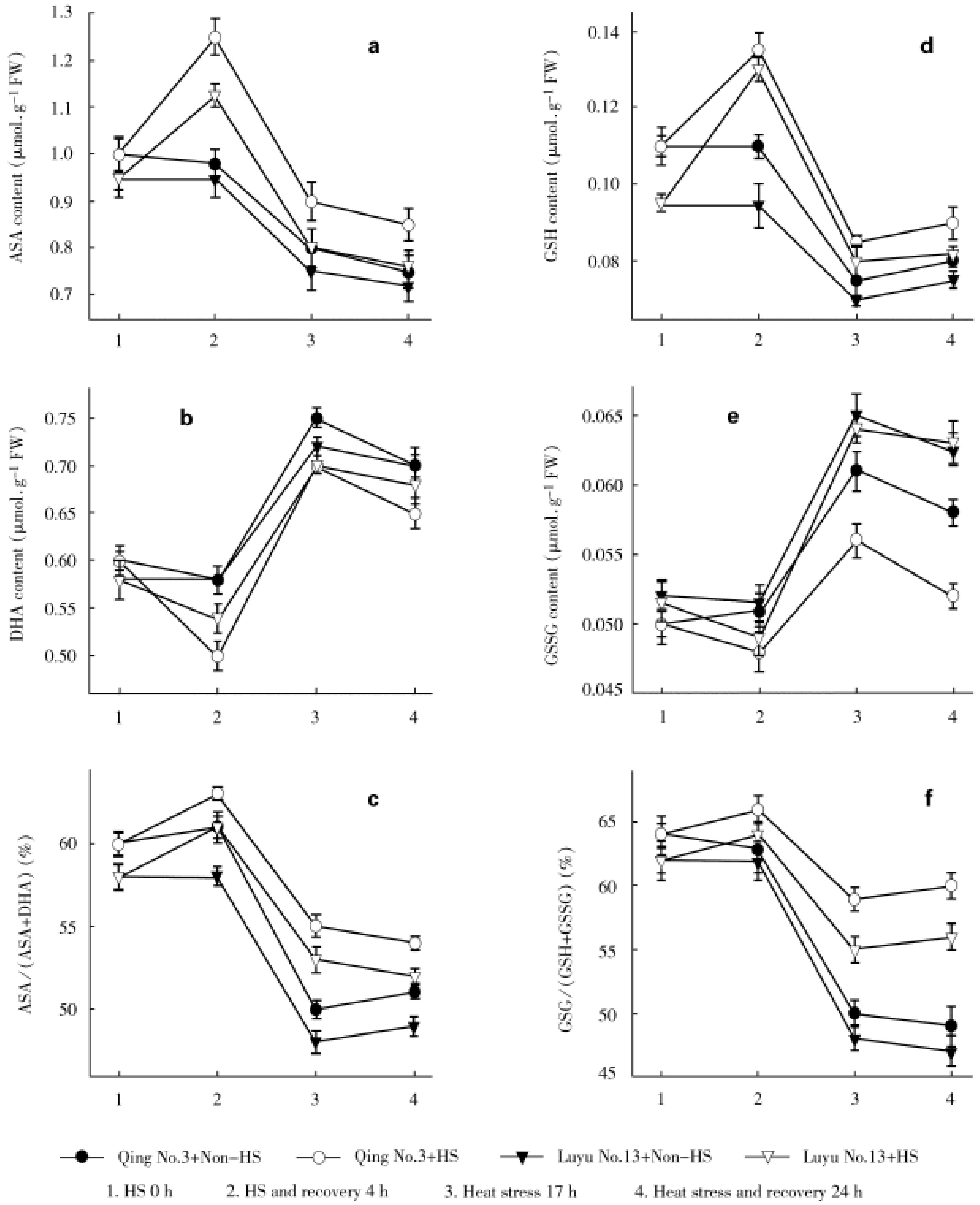

图 3 热激处理后和高温处理及恢复过程中玉米幼苗中抗氧化剂 ASA (a), DHA (b), GSH (d), GSSG (e) 含量及其比例 (c, f) 的变化

Fig. 3 Changes of levels of antioxidant ASA (a), DHA (b), GSH (d), GSSG (e) and their ratio (c, f) after the heat shock, heat stress and recovery in maize seedlings

玉米幼苗 ASA 和 GSH 含量分别提高了 31.6%和 22.7%，而鲁玉 13 分别提高了 19%和 35%（图 3a，d）；对于氧化型的抗氧化剂 DHA 和 GSSG，两种玉米幼苗都呈现出下降的趋势，DHA 尤为明显（图 3：b，e）。

当两种玉米幼苗在 48℃高温下处理 17 h 后，

其还原型的抗氧化剂水平 ASA 和 GSH 呈现出不同程度的下降；相反，DHA 和 GSSG 水平明显上升。但经热激处理的玉米幼苗比对照组始终保持相对较高的还原型抗氧化剂 GSH 和 ASA 水平及较低的氧化型抗氧化剂 DHA 和 GSSG 水平（图 3：a，b，d，e）。

经过高温处理并恢复 24 h 后，玉米幼苗抗氧化剂水平呈现不同的变化趋势，GSH 有所回升，GSSG 水平明显下降，而 ASA 及 DHA 的水平变动不大（图 3：d，b，a，e）。总体而言，经热激处理的玉米幼苗在高温处理后的恢复过程中保持着较高的还原型抗氧化剂及较低的氧化型抗氧化剂水平。

细胞的还原型 氧化型抗氧化剂比例代表着细胞的氧化还原状态，而维持较高的还原型 氧化型抗氧化剂比例有助于提高植物的抗逆性（Noctor and Foyer，1998；Xiang 等 2001）。在本实验中，热激处理过的玉米幼苗与未经热激处理的对照相比，在热激处理后、高温处理后及恢复期间，都能保持相对较高的还原型 氧化型抗氧化剂的比例，这在高温处理后尤为明显（图 3：c，f）。

另外，晴 3 玉米幼苗与鲁玉 13 玉米幼苗相比，无论是热激处理并恢复 4 后，还是高温处理及恢复期间，晴 3 玉米幼苗的 ASA、GSH、ASA/(ASA + DHA) 和 GSH/(GSH + GSSG) 都高于鲁玉 13，而氧化型抗氧化剂 DHA 和 GSSG 水平低于鲁玉 13 品种（图 2：a～e）。

3　讨论

我们以前的研究（Gong 等，2001）和现在的结果（图 1）都清楚地表明热激处理可提高玉米幼苗的耐热性。但热激处理提高植物耐热性的机制尚未完全清楚（Gong 等，1998a，2001；Wang 等 2004）。我们实验室近年来的一系列研究表明，植物固有的、ABA 及外源钙处理诱导的玉米幼苗耐热性的形成与细胞抗氧化酶系统活性的增强密切相关（Gong 等，1997，1998b）。

近几年来，许多研究表明各种逆境胁迫都可诱发细胞内以 H_2O_2 为代表的活性氧水平的增加而导致氧化胁迫，而植物抗逆性的形成常常与抗氧化酶系统活性的增强密切相关（Alscher 等，1997；Mallick and Mohn 等，2000；Bowler and Fluhr，2000；Vranova 等，2002a）。抗氧化酶系统 SOD、CAT、APX 和 GPX，以及抗氧化剂非酶系统 ASA 和 GSH 在植物抗氧化系统中扮演着极其重要的作用（Nover 等，1989；Gong 等，1997；Xiang 等，2001）。我们的前期工作也表明，抗氧化酶系统活性的增强和抗氧化剂水平的提高是外源 H_2O_2 预处理提高玉米幼苗耐热性的重要生理基础之一（李忠光和龚明，2003）。此外，热激可诱导玉米幼苗中 H_2O_2 水平的增加（Gong 等，2001），以此作为逆境胁迫信号分子，一方面诱导 SOD、CAT、APX、GST 等抗氧化酶及抗氧化剂合成酶基因的表达（Vranova 等，2002b；Morita 等，1999；Polidoros and Scandalios 等，1999；Neill 等，2002）；另一方面诱发胞内另一个第二信使 Ca^{2+} 水平的迅速增加及上调钙调素（calmodulin，CaM）基因表达（Pei 等，2000；Desikan 等，2001；McAinsh 等，1996；Price 等，1994），进一步激活 Ca^{2+} CaM 依赖的抗氧化酶活性如 SOD、CAT、GPX 等（Yang and Poovaiah，2002；Gong and Li，1995），从而提高植物细胞内抗氧化酶系统的活性和抗氧化剂的水平。本文中，热激处理后不同程度地提高了晴 3 和鲁玉 13 两种玉米幼苗抗氧化酶 GR、SOD、CAT 和 APX 的活性（图 2：a～d），以及还原型抗氧化剂 ASA 和 GSH 的水平（图 3：a，d），并使热激处理的幼苗在高温处理期间及其后的恢复过程中保持相对较高的抗氧化酶活性和还原型 氧化型抗氧化剂比例。此外，与耐热性较弱（图 1）的鲁玉 13 相比，耐热性较强（图 1）的晴 3 玉米幼苗无论是在正常培养条件下，还是在热激后、高温处理期间及其后的恢复过程中保持相对较高的抗氧化酶活性和还原型 氧化型抗氧化剂比例（图 2：a～d；图 3：a，d）。以上结果表明热激处理后细胞抗氧化酶系统活性的增强和抗氧化剂水平的提高可能是热激诱导的玉米幼苗耐热性形成的重要的生理基础。

〔参考文献〕

Alscher RG, Donahue JL, Cramer CL, 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells [J]. *Physiol Plant*, **100**: 224—233

Bowen J, Lay-Yee M, Plummer K *et al*. 2002. The heat shock response

is involved in thermotolerance in suspension cultured cells [J]. *J Plant Physiol*, **159**: 599—606

Bowler C, Fluhr R, 2000. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-adaptation [J]. *Trends Plant Sci*, **5**: 241—246

Breusegem FV, Vranova E, Dat JF *et al*. 2001. The role of active oxygen species in plant transduction [J]. *Plant Sci*, **161**: 405—414

Burke JJ, 2001. Identification of genetic diversity and mutations in higher plant acquired thermotolerance [J]. *Physiol Plant*, **112**: 167—170

Desikan R, A-H-Mackerness S, Hancock JT *et al*. 2001. Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress [J]. *Plant Physiol*, **127**: 159—172

Gong M, Li ZG, 1995. Calmodulin-binding proteins from maize germs [J]. *Phytochemistry*, **40**: 1335—1339

Gong M, Chen SN, Song YQ *et al*. 1997. Effect of calcium and calmodulin on intrinsic heat tolerance in relation to antioxidant systems in maize seedlings [J]. *Aust J Plant Physiol*, **24**: 371—379

Gong M, van der Luit AH, Knight MR *et al*. 1998a. Heat-shock-induced change in intracellular Ca^{2+} level in Tobacco Seeding in relation to thermotolerance [J]. *Plant Physiol*, **116**: 429—437

Gong M, Li YJ, Chen SZ, 1998b. Abascisic acid-induced thermotolerance in maize seedlings is mediated by calcium and associated with antioxidant systems [J]. *J Plant Physiol*, **153**: 488—496

Gong M, Chen B, Li ZG *et al*. 2001. Heat-shock-induced cross adaptation to heat, chilling, drought and salt stress in maize seedlings and involvement of H_2O_2 [J]. *J Plant Physiol*, **158**: 1125—1130

Inze D, Montagu MV, 2002. Oxidative Stress in Plant [M]. London: Taylor & Francis, 1—46

Li ZG (**李忠光**), Li JH (**李江红**), Du CK (**杜朝昆**) *et al*. 2002. Simultaneous measurement of five antioxidant enzyme activities using a single extraction systems [J]. *J Yunnan Norm Univ* (Nature Science Edition) (**云南师范大学学报·自然科学版**), **22** (6): 45—48

Li ZG (**李忠光**), Du CK (**杜朝昆**), Gong M (**龚明**), 2003. Simultaneous measurement of ASA/DHA and GSH/GSSG using a single extraction systems [J]. *J Yunnan Norm Univ* (Nature Science Edition) (**云南师范大学学报·自然科学版**), **23** (3): 67—70

Li ZG (**李忠光**), Gong M (**龚明**), 2003. Involvement of antioxidant systems in the formation of H_2O_2-induced heat tolerance in Maize seedlings [J]. *Plant Physiol Commun* (**植物生理学通讯**), **39** (6): 575—579

Mallick N, Mohn FH, 2000. Reactive oxygen species response of algal cells [J]. *J Plant Physiol*, **157**: 183—193

McAinsh MR, Clayton H, Mansfied TA *et al*. 1996. Changes in stomatal behavior and guard cell cytosolic free calcium in response to oxidative stress [J]. *Plant Physiol*, **111**: 1031—1042

Morita S, Kaminaka H, Masumura T *et al*. 1999. Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress: the involvement of hydrogen peroxide in oxidative stress signaling [J]. *Plant Cell Physiol*, **40**: 417—422

Neill S, Desikan R, Hancock J, 2002. Hydrogen peroxide signaling [J]. *Curr Opin Plant Biol*, **5**: 388—395

Nover L, Neumann D, Scharf KD, 1989. Heat Shock and Other Stress Response Systems of Plants [M]. Berlin: Springer-Verlag, 1—75

Noctor G, Foyer CH, 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **49**: 249—279

Pei ZM, Murata Y, Benning G *et al*. 2000. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediated abscisic acid signalling in guard cells [J]. *Nature*, **406**: 731—734

Polidoros A, Scandalios J, 1999. Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.) [J]. *Plant Physiol*, **106**: 112—120

Price AH, Taylor A, Ripley SJ *et al*. 1994. Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium [J]. *Plant Cell*, **6**: 1301—1310

Vranova E, Inze D, Breusegem FV, 2002a. Signals transduction during oxidative stress [J]. *J Exp Bot*, **53**: 1227—1236

Vranova E, Atichartpongkul S, Villarroel R *et al*. 2002b. Comprehensive analysis of gene expression in *Nicotiana tabacum* leaves acclimated to oxidative stress [J]. *Plant Physiol*, **99**: 10870—10875

Wang W, Vinocur B, Shoseyor O *et al*. 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response [J]. *Trends Plant Sci*, **9**: 244—252

Xiang CB, Werner BL, Christensen EM *et al*. 2001. The biological functions of glutathione revisited in *Arabidopsis* transgenic plant with altered glutathione levels [J]. *Plant Physiol*, **126**: 564—574

Yang T, Poovaiah BW, 2002. Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by Calcium calmodulin [J]. *Proced Natl Acad Sci USA*, **99**: 4097—4102